

РАЗРАБОТКА НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ
ИК-ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ
ПРОИЗВОДНЫХ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА *a*
И НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА ДЛЯ
ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ
ТЕРАПИИ РАКА

© 2015 И.В. Пантюшенко¹, П.Г. Рудаковская^{2,3}, А.В. Старовойтова⁴,
А.А. Михайловская⁴, М.А. Абакумов⁵, М.А. Каплан⁴, А.А. Цыганков⁶,
А.Г. Мажуга^{2,3}, М.А. Грин^{1*}, А.Ф. Миронов¹

¹ Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, 119573 Москва;
электронная почта: michael_grin@mail.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119991 Москва;
электронная почта: alexander.majouga@gmail.com

³ Национальный исследовательский технологический университет
«МИСиС», лаборатория биомедицинских наноматериалов,
119991 Москва

⁴ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба,
филиал ФМИЦ им. П.А. Герцена Минздрава России, 249036 Обнинск
Калужской обл.; электронная почта: kaplan@mrrc.obninsk.ru

⁵ Российский национальный исследовательский университет
им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997 Москва;
электронная почта: abakimov88@gmail.com

⁶ Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
142290 Пущино Московской обл.;
электронная почта: ttt-01@rambler.ru

Поступила в редакцию 05.02.15

После доработки 07.03.15

Получено новое серосодержащее производное бактериохлорофилла *a*. Последний был выделен из биомассы несерных пурпурных бактерий *Rhodobacter capsulatus* штамм В10. Предлагаемый фотосенсибилизатор представляет собой *N*-аминобактериопурпуринимид, экзоциклическая аминогруппа которого ацилирована остатком липоевой кислоты, являющейся биогенным соединением, выполняющим в организме функцию кофактора пируватдегидрогеназного и α -кетоглутаратдегидрогеназного комплексов. Благодаря наличию дисульфидной группировки в молекуле липоевой кислоты, пигмент приобрел ауروفильные свойства и был иммобилизован на поверхности наночастиц золота (НЧ-Au) за счет образования связей S-Au. Форма и размеры полученных частиц с иммобилизованным фотосенсибилизатором (ФС-Au) определены методами динамического светорассеяния (ДСР) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Наноструктурированный ФС представляет собой сферы с гидродинамическим диаметром 100–110 нм, поглощает свет в области 824 нм и интенсивно флуоресцирует при 830 нм, что позволило изучить кинетику его распределения в органах, здоровых и опухолевых тканях у животных — опухоленосителей. Сравнение биологических свойств свободного (ФС) и иммобилизованного (ФС-Au) пигментов в экспериментах на крысах с саркомой М-1 показало, что иммобилизация бактериопурпуринимид на НЧ золота увеличивает время циркуляции наноструктурированного ФС в кровотоке и повышает его тропность к опухоли за счет неспецифического таргетинга, включающего экстравазацию наночастиц, нагруженных пигментом, из дефектных сосудов опухоли.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бактериохлорофилл *a*, бактериопурпуринимид, фотосенсибилизаторы, фотодинамическая терапия, липоевая кислота, наночастицы золота, саркома М-1.

* Адресат для корреспонденции.

Основными методами лечения в онкологии являются хирургическое вмешательство, лучевая терапия и химиотерапия. Однако в последние два десятилетия все большее распространение получают новые методы, среди которых следует отметить *фотодинамическую терапию* (ФДТ), которая является результатом комбинированного действия трех нетоксичных компонентов — фотосенсибилизатора, света и кислорода [1–3]. Противоопухолевые эффекты данного вида лечения обусловлены комбинацией прямого фотоповреждения клеток, разрушения сосудистой сети опухоли и активации иммунного ответа [4–6].

Данный метод лечения обладает малой инвазивностью, высокой избирательностью поражения опухоли, низкой токсичностью вводимых препаратов и отсутствием риска тяжелых местных и системных осложнений.

Вместе с тем важным фактором, ограничивающим применение ФДТ при лечении онкологических заболеваний, является недостаточная глубина проникновения светового излучения, а также невысокая селективность накопления официальных фотосенсибилизаторов в опухоли [7, 8].

В настоящее время применяются в клинике или находятся на разных стадиях клинических испытаний фотосенсибилизаторы (ФС) различных классов (порфирины и их металлокомплексы, хлорины, бензопорфирины, фталоцианины и др.). Среди них особый интерес представляют природные бактериохлорофиллы и их производные с интенсивным поглощением в ближней ИК-области спектра в районе 800 нм, поскольку это открывает новые возможности для диагностики и лечения злокачественных новообразований. Свет с подобной длиной волны проникает в ткань на глубину до 20 мм, что позволяет проводить лечение глубокозалегающих и пигментированных опухолей [9, 10].

Выбор природных пигментов для создания новых ФС обусловлен рядом причин, включая их распространенность в природе, интенсивное поглощение в длинноволновой области спектра, возможность химической модификации боковых заместителей, структурную близость к эндогенным порфиринам, что предполагает низкий уровень токсичности подобных соединений и быстрое выведение из организма.

Однако сами хлорины и бактериохлорины имеют ограниченное применение в качестве ФС из-за высокой гидрофобности, низкой химической и фотостабильности, умеренной селективности накопления в раковых клетках. Это диктует необходимость создания их устойчивых производных с улучшенными спектральными характерис-

тиками, повышенной гидрофильностью для растворимости в полярных растворителях и воде, обладающих значительной тропностью к опухолям [11–15].

Применение наночастиц (НЧ) золота с иммобилизованными на них фотосенсибилизаторами открывает новые возможности для повышения результативности фотодинамической терапии.

Наночастицы золота обладают целым рядом уникальных характеристик, таких как оптические свойства, прочность, высокая площадь поверхности, химическая инертность и способность противостоять окислению даже в ультрадисперсном (наноразмерном) состоянии.

Важным достоинством НЧ золота является их способность накапливаться в опухолевой ткани путем пассивного таргетинга за счет экстравазации наноразмерных материалов из дефектных сосудов опухоли [16–18], либо путем векторной доставки к поврежденной ткани за счет функционализации поверхности НЧ биологически активными макромолекулами, придавая конъюгатам направленность взаимодействия с экзо- и эндоклеточными молекулярными компонентами. В зависимости от формы, размера и характера функционализации поверхности наночастицы золота могут проникать внутрь клеток путем эндоцитоза или закрепляться на внешних структурах клеточной мембраны [19–21].

В последние годы появились научные исследования, в которых успешно реализуется доставка противоопухолевых агентов для химиотерапии [22, 23], а также фотосенсибилизаторов для ФДТ рака с помощью НЧ золота [24–26].

Расширение показаний применения фотодинамической терапии связывают с возможностью ее комбинации с другими методами лечения, в том числе лучевой терапией [27, 28] и локальной гипертермией [29–31].

Считается, что комбинация ФДТ и лучевой терапии может существенно улучшить результаты лечения и уменьшить применяемые дозы ионизирующих излучений, а кроме того, позволит эффективно воздействовать на радиорезистентные опухоли. При облучении рентгеновским излучением с энергией ~100 КэВ, наночастицы золота испускают фотоэлектроны, имеющие достаточно малую длину свободного пробега в теле и быстро передающие свою энергию окружающим клеткам. Таким образом, усиление действия в зоне интереса является достаточно существенным.

В свою очередь, повышение концентрации фотосенсибилизатора, доставленного в опухоль на золотых наночастицах, и реализация фотодинамического воздействия за счет облучения по-

раженной ткани лазерным излучением увеличивает эффективность комбинированной терапии.

Применение НЧ перспективно также в случае использования сочетанной ФДТ и лазерной гипертермии опухолей. Возбуждение плазмонов в наночастицах золота квантами света в видимой или ближней ИК-области спектра приводит к повышенному поглощению и рассеянию ими зондирующего излучения. Путем изменения формы и размера наночастиц можно контролировать длину волны плазмонного резонанса и получать частицы с заданными оптическими свойствами.

Облучение опухоли лазерным излучением, соответствующим длине волны поглощения наночастиц золота, может вызвать локальную гипертермию опухоли за счет их разогрева. Селективное накопление наночастиц в опухолевой ткани резко повышает градиент температуры между опухолью и окружающими здоровыми тканями, что обеспечивает локальность нагрева опухоли. Это делает лазерное воздействие прицельным и снижает его негативное влияние на нормальные ткани. Это открывает широкие перспективы использования локальной лазерной гипертермии в онкологии.

В настоящей работе проведен синтез ауофильного производного Бхл *a*, которое было ковалентно присоединено к НЧ золота, изучены спектральные, фотофизические и биологические свойства полученного наноструктурированного ФС.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы раствор гидразин гидрата (Hydrazine Hydrate Solution, «Merck», Германия), α -липоевая кислота (Alpha Lipoic Acid, «Sigma-Aldrich», США), Кремофор ELP (Cremophor ELP, «BASF», Германия), а также реагенты и растворители отечественного производства. Растворители были очищены и подготовлены по стандартным методикам. Бактериопурин получен из бактериохлорофилла *a* с использованием разработанного нами метода [32].

Хроматографию в тонком слое осуществляли на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ («Merck», Германия) в хлористом метиле. Спектры ЯМР регистрировали в дейтерохлороформе на спектрометре «Bruker» DPX-300 (Германия) с рабочей частотой 300 МГц. Масс-спектры получены на время-пролетном масс-спектрометре «Bruker» Ultraflex TOF/TOF (Германия) методом MALDI с использованием в качестве матрицы дигидроксibenзола (ДНВ). Электронные спектры

поглощения получены на спектрофотометре Ultrospec 2100 Pro («GE Healthcare», США), в кварцевых кюветах толщиной 10 мм. Все спектральные исследования выполняли при 25°. Осаждение было проведено на центрифуге Elmi Skyline CM50 («ELMI», Латвия). Определение размеров частиц методом ДСП осуществляли на наносайзере ZetasizerNanoZS (173°, «Malvern Instruments Ltd.», Великобритания) с He-Ne лазером (633 nm, 5 mV). Микрофотографии получены на просвечивающем электронном микроскопе JEOLJEM-2100F/Cs/GIF (200 kV, 0,8 A). Флуоресцентная визуализация лабораторных животных *in vivo* была осуществлена с помощью аппарата IVIS Spectrum-CT.

Конъюгат *N*-аминобактериопурпуринимида с липоевой кислотой (ФС) 4. К раствору 30 мг (0,048 ммоль) *N*-аминобактериопурпуринимида **3** в 5 мл хлористого метилена прибавляли 20 мг (0,096 ммоль) α -липоевой кислоты и 12 мг (0,048 ммоль) *N*-карбоэтокси-2-этокси-1,2-дигидрохинолина (EEDQ). Полученный раствор перемешивали в течение 36 ч при комнатной температуре. Ход реакции контролировали спектрофотометрически и с использованием ТСХ. Затем реакционную смесь разбавляли 150 мл дистиллированной воды и экстрагировали хлористым метилом до полного обесцвечивания органического слоя (3 × 30 мл). Экстракты объединяли, сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали на ротационном испарителе. Полученный продукт очищали с помощью препаративной ТСХ на силикагеле в системе CH₂Cl₂ : CH₃OH (v/v 50 : 1).

Выход конъюгата 65%. Спектр ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃, 50°, δ , м.д.): 9,10 (с, 10-H), 8,75 (с, 5-H), 8,50 (с, 20-H), 5,25 (м, 17-H), 4,33 (м, 18-H, 7-H), 4,1 (м, 8-H), 3,68 (с, 12-CH₃), 3,60 (д, *J* = 5,1 Гц, 4H, -CHCH₂S-), 3,55 (с, 17^s-CH₃), 3,50 (с, 2-CH₃), 3,40–3,60 (1H, -CH₂CHS-S), 3,18 (с, 3²-CH₃), 3,05–3,12 (2H, -CH₂S-S-), 2,75 (м, 8¹-CH₂), 2,42–2,50 (4H, -S-CHCH₂CH₂CH₂-, -S-CHCH₂-), 2,4 (м, 17²-CH₂), 2,30 (т, *J* = 6,7 Гц, 2H, -CH₂C(O)), 2,1 (м, 17¹-CH₂), 1,85 (д, *J* = 7 Гц, 7-CH₃), 1,71–1,93 (2H, -CH₂CH₂CH₂C(O)), 1,70 (д, *J* = 8 Гц, 18-CH₃), 1,60–1,68 (2H, -CH₂CH₂C(O)), 1,12 (т, *J* = 7 Hz, 8²-CH₃), -0,25 (с, NH), -0,5 (с, NH).

Масс-спектр, (MALDI), *m/z*: 799 (M+).

UV-VIS (H₂O/кремофор 4%), λ_{\max} , нм (относ. инт.): 365, 415 (Core), 551 и 824 (1 : 0,68 : 0,39 : 0,92).

Получение мицеллярной водной дисперсии конъюгата метилового эфира *N*-аминобактериопурпуринимида с липоевой кислотой. Раствор 10 мг ФС **4** в 3 мл хлористого метилена порциями по 0,5 мл с периодичностью в 8–10 мин добавляют в 10 мл 4%-ного раствора Кремофора в деионизованной воде. Под непрерывным током аргона

в термостатируемой водяной бане при 40° выпаривают хлористый метилен до полного перехода ФС 4 в водную эмульсию, которую затем стерилизуют фильтрацией на фильтрах «Millipore» (США) 0,4 мкм и концентрацию фильтрата доводят до необходимого значения путем разбавления деионизованной водой.

Иммобилизация метилового эфира *N*-аминобактериопурпуринамида с липоевой кислотой (ФС) на наночастицах золота (НЧ-Au). К водному раствору НЧ-Au при интенсивном перемешивании добавляют раствор ФС в расчете 1 мг на 10 мл раствора наночастиц и выдерживают в течение 24 ч. Затем полученный раствор центрифугируют при 15 g в течение 30 мин, декантируют надосадочный слой, содержащий несвязавшийся пигмент, а осадок наночастиц золота с иммобилизованным ФС (ФС-Au) 5 ресуспендируют в 4%-ном водном растворе Кремофора.

Определение емкости наночастиц золота, нагруженных ФС. Количество ФС, иммобилизованного на наночастицы, определяют по разнице концентраций исходного раствора пигмента и надосадочного слоя, декантируемого после центрифугирования наночастиц ФС-Au. Начальную и конечную концентрации ФС определяют на основании интенсивности длинноволновой полосы Q_2 в ЭСП до и после иммобилизации и коэффициента молярной экстинкции для *N*-аминобактериопурпуринамида с остатком липоевой кислоты. Отношение количества иммобилизованного ФС к массе НЧ-Au характеризует емкость последних по данному пигменту.

Подготовка лабораторных животных-опухоленосителей. Для перевивочного материала использовали опухоль крыс-доноров на 14-й день ее развития. Для этого животное наркотизировали хлороформом, выделяли опухолевый узел, очищали от капсулы и некротизированных тканей. Опухолевую ткань механически измельчали в растворе Хенкса. Кусочки опухоли объемом $0,15-0,25 \times 10^{-3} \text{ см}^3$ вводили реципиентам подкожно в левое бедро. На 10–14-е сут после перевивки при достижении нужных размеров опухоли левого узла животное включали в исследование.

Динамика накопления ФС и ФС-Au в опухоли *in vivo*. Динамика накопления ФС и ФС-Au в опухолевом узле изучалась с помощью спектрофлуоресцентного метода на комплексе «Lesa-6» (ЗАО «БИОСПЕК», Россия). В качестве источника излучения, возбуждающего флуоресценцию фотосенсибилизатора в биологических тканях, использовали He-Ne лазер (633 нм). Средняя мощность лазерного излучения 2 мВт, плотность энергии локального лазерного излучения на поверхности тканей в процессе одного исследования не более 1 Дж/см², что существенно ниже уровня

индуцирования необратимых фотодинамических повреждений тканей. Перед проведением процедуры кожа животных в области опухоли, а также небольшой участок кожи на другом бедре (визуально здоровые ткани) депилировали.

Спектрофлуоресцентные исследования проводили под прямым углом к объекту, слегка касаясь торцом оптоволоконного световода ткани. Процедура регистрации флуоресцентного спектра (время экспозиции) занимала 1–2 с. Полученные путем точечных измерений спектры тканей центра и периферии опухоли, а также визуально здоровой кожи анализировали по форме, величине и амплитуде сигнала. Далее определяли нормированную флуоресценцию (ФН) S_2/S_1 — отношение площадей под кривыми в спектрах флуоресценции и отраженного от тканей лазерного излучения. Для оценки селективности накопления фотосенсибилизатора в опухоли по отношению к здоровым тканям рассчитывали индекс контрастности — отношение среднего по группе значения S_2/S_1 в области опухолевых тканей к среднему по группе значению S_2/S_1 в области здоровых тканей. Измерение мощности лазерного излучения на выходе оптического волокна проводили сферическим дозиметром. В работе использовали «Латус» (ЗАО «Полупроводниковые приборы», Россия). Для доставки световой энергии к опухоли применяли гибкие моноволоконные кварцевые световоды.

Плотность мощности лазерного излучения рассчитывали путем деления величины мощности на выходе световода на площадь облучения. $P_s = P_v/S$, где P_s — плотность мощности (Вт/см²), P_v — выходная мощность (Вт), S — площадь светового пятна. Световое пятно рассчитывали таким образом, чтобы помимо опухолевого узла, по периферии захватывались здоровые ткани (3–5 мм). Время облучения определяли путем деления заданной величины плотности энергии, которую необходимо подвести к опухоли, на рассчитанную плотность мощности.

$T = E/P_s$, где T — время облучения (с), E — плотность энергии (Дж/см²), P_s — площадь мощности (Вт/см²).

Флуоресцентная визуализация лабораторных животных *in vivo*. Для наркоза использовали ингаляционную смесь воздуха и 2% изофлурана («Abbott», USA). После наркотизации крысам вводили препараты в дозе 2,5 мг/кг внутри-брюшинно. Для получения флуоресцентных изображений использовали прибор IVIS Spectrum-CT (РНИМУ им. Н.И. Пирогова, кафедра медицинских нанобиотехнологий). Возбуждение флуоресценции проводили при длинах волн 710 и 745 нм, а детекцию испускаемого света при длинах волн 780, 800, 820 и 840 нм. Для разделения

сигналов флуоресценции от ткани и флуорофора проводили спектральный анализ с использованием программного обеспечения Living Image 4.4 («PerkinElmer», США). Интенсивность флуоресценции измеряли в фотон/с/см².

Статистическая обработка результатов. Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики. Оценку уровня статистической значимости различий средних значений исследуемых показателей в опытных и контрольных группах оценивали, используя непараметрический U-критерий (Манна–Уитни) при 95%-ном уровне значимости. Данный критерий выбран, так как сравниваемые выборки не подчиняются закону нормального распределения. Статистическую обработку проводили с помощью программного пакета Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве ключевого соединения в работе был использован *N*-аминобактериопурпуринимид, который обладает высокой стабильностью, поглощает в области 830 нм и, как показали эксперименты на животных, проявляет высокую фотоиндуцированную активность [33]. Последний получали взаимодействием бактериопурпурина **2** с гидразин гидратом в пиридине по известной методике [34]. В свою очередь, бактериопурпурин был получен алломеризацией бактериохлорофилла *a* (Бхл *a*) **1**, продуцентом которого являлись пурпурные несерные бактерии *Rhodobacter capsulatus* штамм В10, выращивание которых проводили в хемогетеротрофных условиях по методу, описанному ранее [35–38]. Содержание Бхл *a* составляло 10–14 мг пигмента на грамм сухой биомассы.

Ацилирование *N*-аминобактериопурпуринимида **3** липоевой кислотой в присутствии конденсирующего агента EEDQ приводит к образованию серосодержащего пигмента **4**, иммобилизация которого на НЧ золота за счет образования связи S-Au позволила получить наноструктурированный ФС **5** (схема).

Поскольку бактериопурпуринимид с остатком липоевой кислоты **4** является гидрофобным соединением, был приготовлен его водный раствор с использованием Кремофора ELP, который является оптимальным и часто используемым солюбилизатором, обладающим дезагрегирующим действием для слабо растворимых в воде ФС порфириновой природы [39].

Иммобилизацию проводили путем перемешивания мицеллярной водно-кремофорной дисперсии пигмента **4** с водным раствором наночастиц золота в течение суток, последующим от-

делением наночастиц с иммобилизованным фотосенсибилизатором **5** центрифугированием и ресуспендированием образовавшегося осадка ФС-Au в 4%-ном растворе Кремофора в воде. Степень иммобилизации ФС составила 22%, что в пересчете на емкость наночастиц – 80 молекул пигмента на одну НЧ золота.

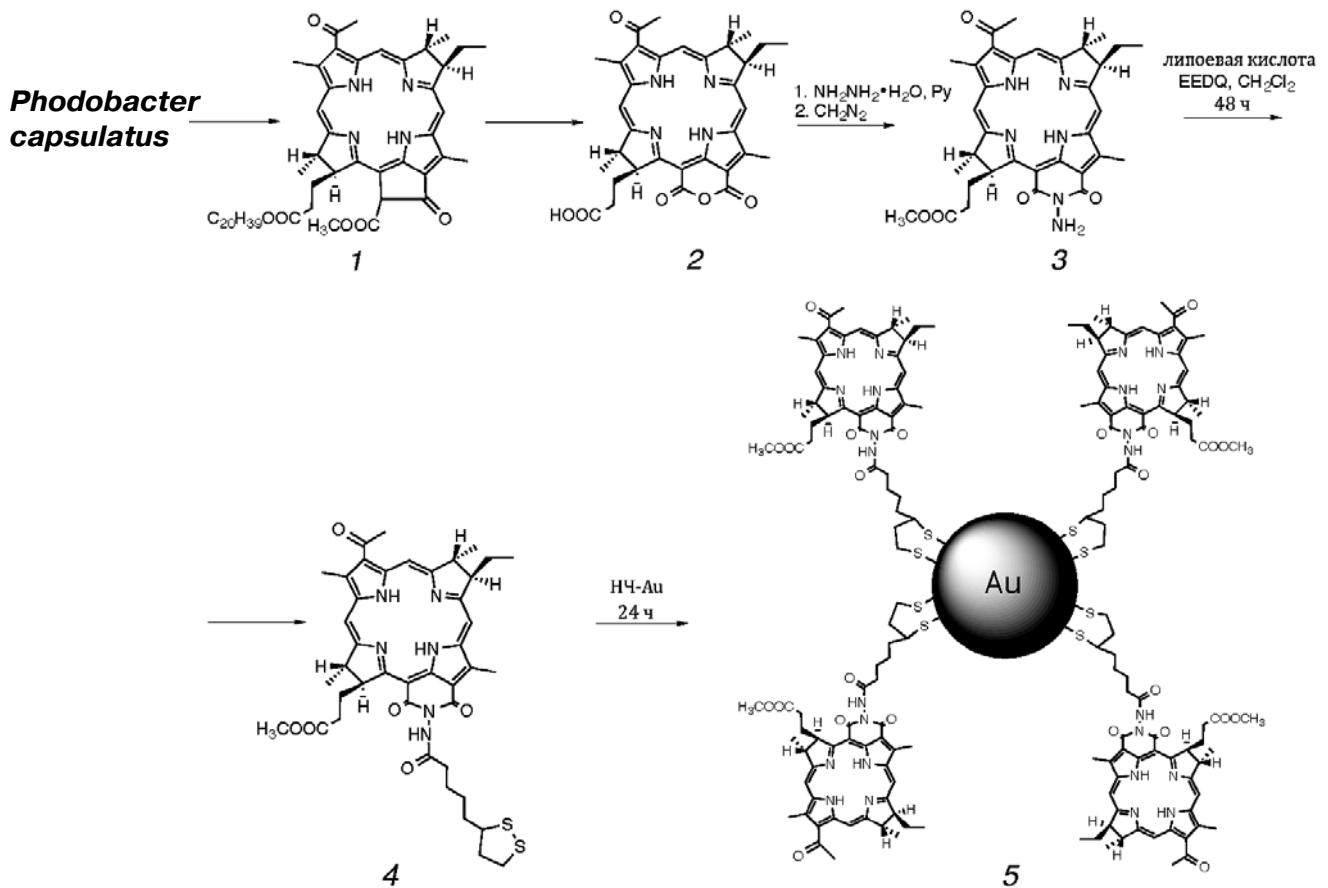
Наличие полос Q1 (550 нм) и Q2 (824 нм) в электронном спектре поглощения (ЭСП) суспензии подтвердило факт иммобилизации пигмента на НЧ золота, а характер сигналов свидетельствует о мономерной форме ФС. Сигнал от НЧ-Au в ЭСП проявляется в виде «плеча» при 520 нм (рис. 1).

Собственная флуоресценция у производных бактериохлорофилла *a* делает возможным мониторинг накопления НЧ золота в опухоли. Облучение полученного в настоящей работе наноструктурированного фотосенсибилизатора ФС-Au **5** светом с длиной волны полосы Q1 приводит к интенсивной флуоресценции при 830 нм (рис. 2), что позволило нам изучить кинетику распределения в органах и тканях, а также накопление фотосенсибилизатора в опухоли.

Наночастицы золота были получены по методу Туркевича [40], восстановлением золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия. Реакция приводит к образованию растворимых в воде, покрытых цитрат-ионами частиц золота [41], размеры которых, а также размеры НЧ с иммобилизованным бактериопурпуринимидом **5** были определены с использованием метода динамического светорассеяния (ДСР) (рис. 3), а микрофотографии наночастиц получены с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) (рис. 4).

Согласно полученным данным, после иммобилизации ФС на наночастицах золота было зафиксировано значительное увеличение гидродинамического размера последних с 10–12 нм – для свободных НЧ до 100–110 нм – для ФС-Au. На микрофотографиях (рис. 4) наблюдается небольшое число агрегатов НЧ после иммобилизации на них пигмента.

Метод ПЭМ был использован в работе для определения размера и морфологии металлического ядра, однако данный метод не позволяет оценить размер органической оболочки на поверхности наночастиц. В связи с этим, универсальным и общепринятым методом анализа наногибридных материалов на основе наночастиц металлов, терапевтических агентов и полимерных стабилизаторов является метод ДСР. Полученная данным методом величина гидродинамического радиуса наночастиц золота свидетельствует о модификации их поверхности органическим лигандом (липоевая кислота), несущей



Синтез наноструктурированного ФС на основе *N*-аминобактериопурпуринимида и наночастиц золота (ФС-Au) 5

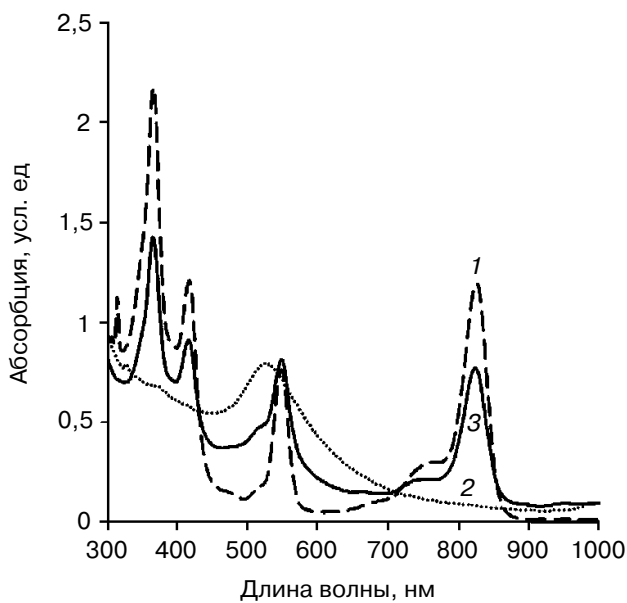


Рис. 1. Электронный спектр поглощения мицеллярной водно-кремоформной дисперсии фотосенсибилизатора ФС (пунктирная линия 1), наночастиц золота НЧ-Au (прерывистая линия 2) и мицеллярной водно-кремоформной дисперсии наноструктурированного фотосенсибилизатора ФС-Au (сплошная линия)

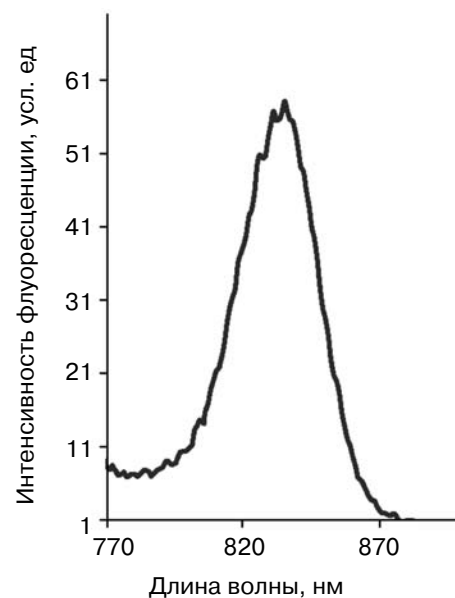


Рис. 2. Спектр флуоресценции мицеллярной водно-кремоформной дисперсии наноструктурированного фотосенсибилизатора ФС-Au (возбуждение в полосу 540 нм)

шим фотодинамический агент, а также Кремофором, являющимся стабилизатором. Увеличение размера наночастиц связано также с их частичной агрегацией.

Исследование кинетики накопления свободного ФС 4 и наночастиц золота с иммобилизованным пигментом ФС-Au на модели экспериментальной опухоли крыс саркома М-1. Изучение накопле-

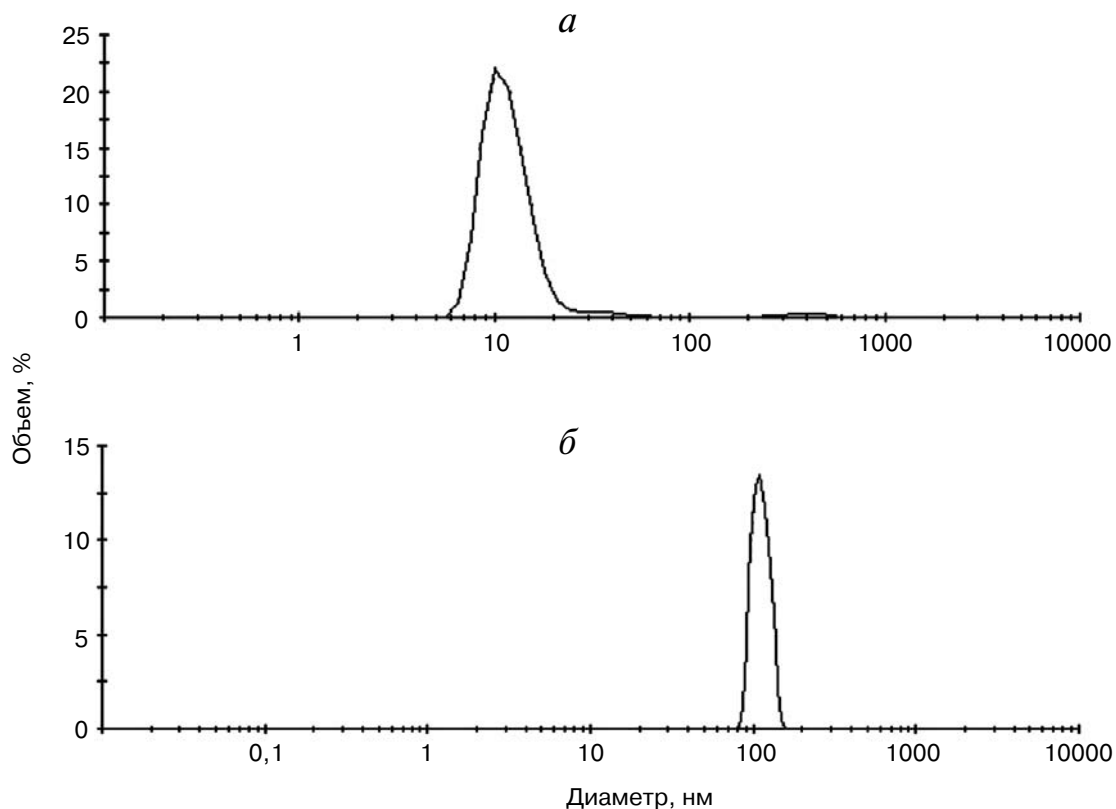


Рис. 3. Распределение по размерам (данные ДСР) немодифицированных наночастиц золота (а) и НЧ с иммобилизованным фотосенсибилизатором ФС-Au (б)

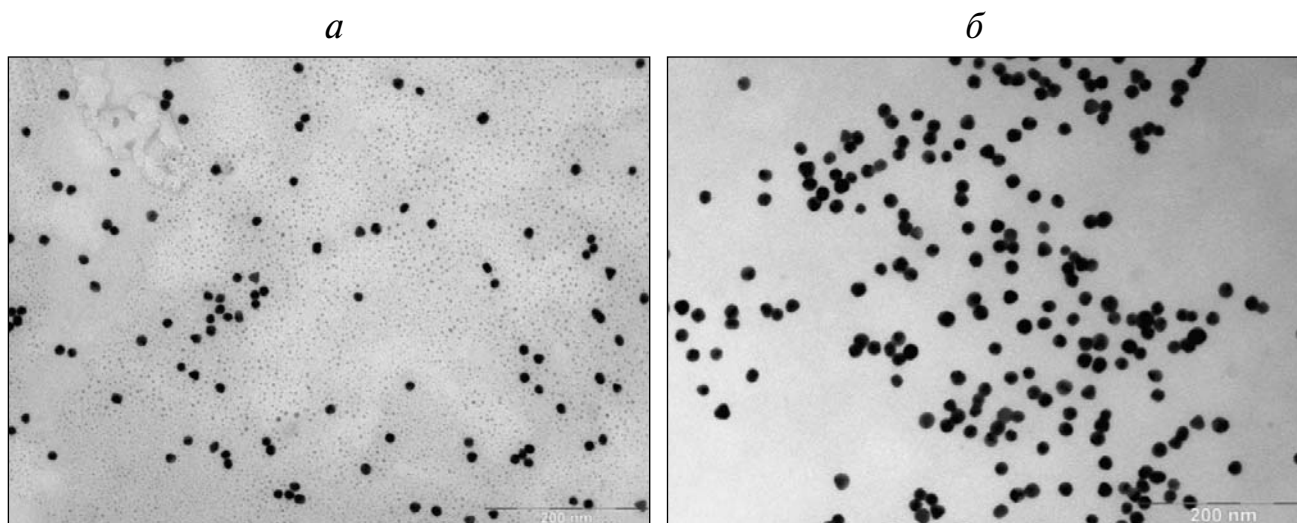


Рис. 4. Микрофотографии немодифицированных наночастиц золота (а) и НЧ с иммобилизованным фотосенсибилизатором ФС-Au (б)

ния свободного и иммобилизованного ФС было реализовано на беспородных крысах, полученных из вивария ФГБУ МРНЦ Минздрава России и содержащихся в стандартных условиях. Эффективность фотодинамического воздействия определяли уровнем и местом накопления ФС и особенностями его распределения в опу-

холевой и окружающих тканях, по наличию флуоресценции свободного и иммобилизованного бактериопурпуринида методом локальной флуоресцентной спектроскопии (ЛФС) и уровню нормированной флуоресценции (ФН) пигмента в опухоли и окружающей ткани у крыс с саркомой М-1 (рис. 5, а, б).

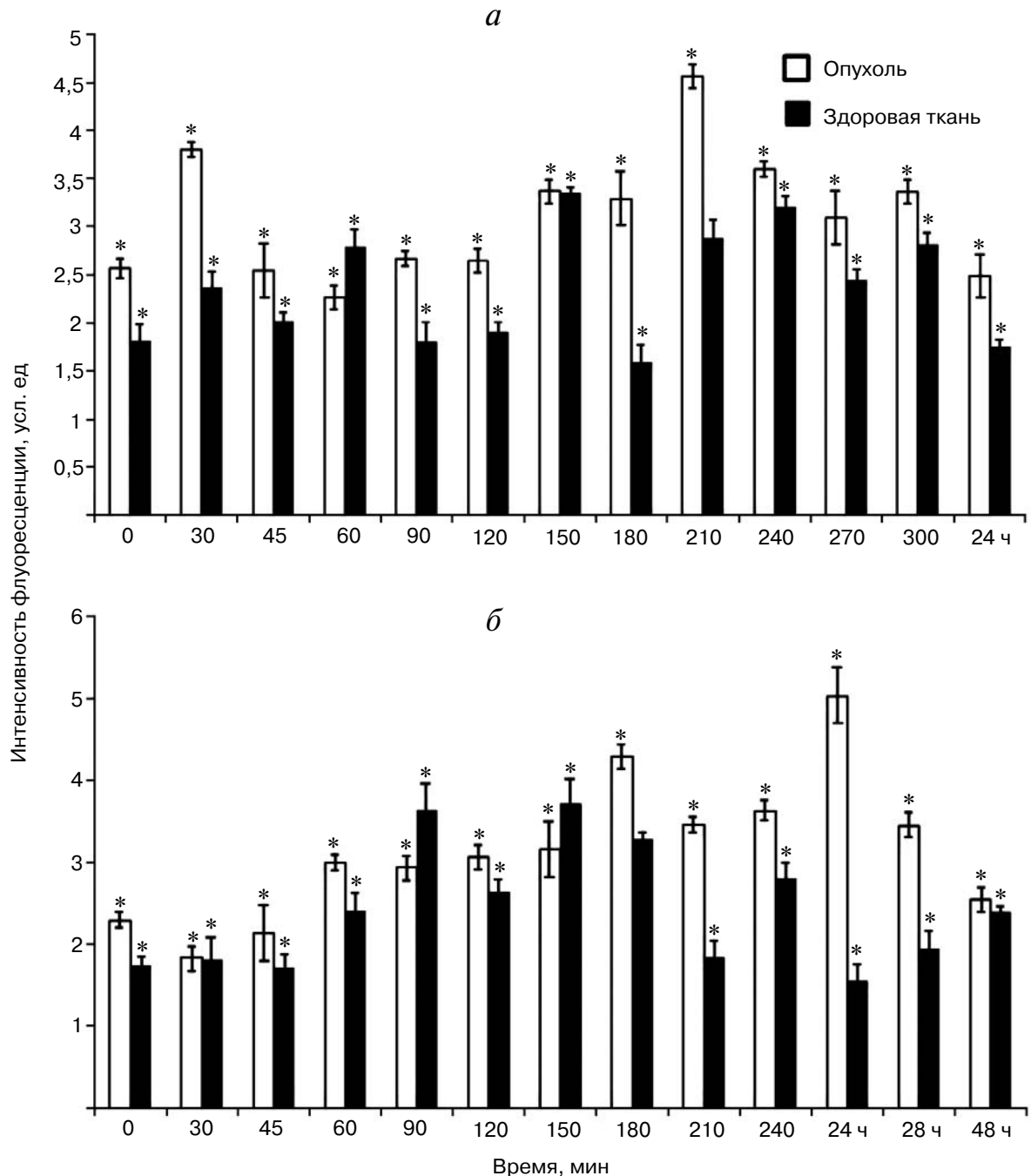


Рис. 5. Кинетика накопления ФС 4 (а) и ФС-Аи 5 (б) в опухоли, определенная на основании значений нормированной флуоресценции в тканях опухоли саркомы М-1 в интервале от 5 с до 48 ч в дозе 2,5 мг/кг. Результаты выражены в виде среднего значения трех независимых экспериментов; * $p < 0,05$ (достоверность 95%)

Как видно из диаграмм, представленных на рисунке, иммобилизация на наночастицах золота принципиально изменяет кинетику накопления ФС в опухоли и здоровой ткани. Если для свободного бактериопурпуринамида **4** максимальное накопление в опухоли достигается за 3,5 ч (210 мин, рис. 5, *a*), то в случае иммобилизованного ФС накопление в опухолевой ткани нарастает постепенно в течение суток, достигая максимума к 24 ч (рис. 5, *б*).

В ходе исследования рассчитывали флуоресцентную контрастность (ФК) как отношение ФН в опухоли к ФН в коже и мышце (рис. 6, *a, б*). Показано, что изученные в данной работе свободный бактериопурпуринамид **4** и его наноструктурированная форма обладают тропностью к опухолевой ткани саркомы М-1. Однако максимальные величины флуоресцентной контрастности относительно флуоресцентной контрастности относительно регистрируются через разные про-

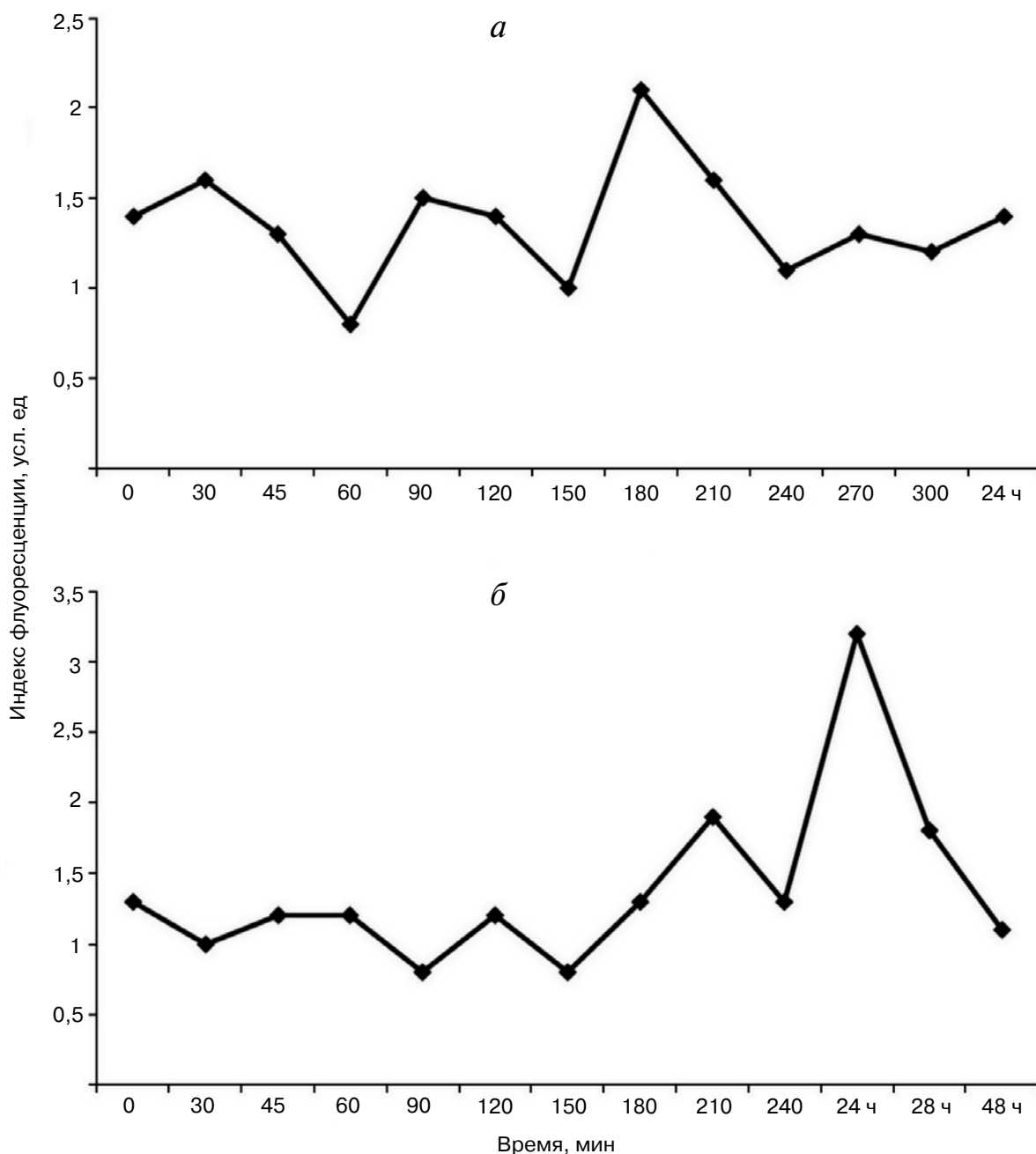


Рис. 6. Флуоресцентная контрастность бактериопурпуринамида **4** (*a*) и ФС-Ау **5** (*б*) в тканях опухоли саркомы М-1 в интервале от 5 с до 24 ч в дозе 2,5 мг/кг

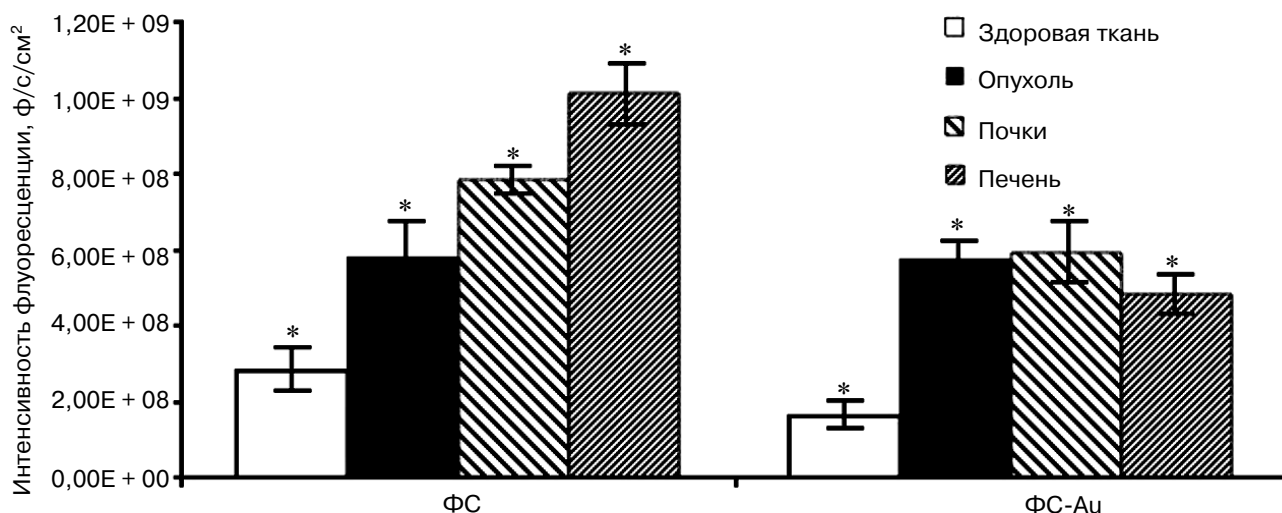


Рис. 7. Нормированная флуоресценция ФС и ФС-Au в опухоли, здоровой ткани и внутренних органах в период времени максимального накопления пигментов в опухоли при дозе 2,5 мг/кг. Результаты выражены в виде среднего значения трех независимых экспериментов; * $p < 0,05$ (достоверность 95%)

межутки времени после введения препаратов: для **4** – ФК составляет $2,1 \pm 0,3$ усл. ед через 3,5 ч (рис. 6, *a*), тогда как для **5** – ФК составляет $3,2 \pm 0,5$ усл. ед через 24 ч (рис. 6, *b*). В последующие сроки ФН пигментов в опухоли снижается схожим образом (на рис. 6 не показано). Через 72 ч уровень ФН в опухолевой ткани снижается на 96–97% от максимального значения. В коже и мышце максимальные значения флуоресценции для соединений **4** и **5** регистрируются через 15 мин после введения ФС, а через 72 ч ФН в них уже не определяется.

Кроме того, в данной работе было исследовано распределение свободного ФС **4** и наноструктурированного ФС-Au **5** в органах (печень, почки) в период времени максимального накопления пигментов в опухоли (для ФС – 210 мин; для ФС-Au – 24 ч, рис. 7). Показано, что печень и почки активно накапливают ФС (рис. 8, см. цветную вклейку), однако соотношение величин ФН бактериопурпуринамида (ФС) и его наноструктурированной формы (ФС-Au) в опухоли и органах различно, при этом наноструктурированный препарат проявляет более высокую тропность к опухолевой ткани.

В данной работе была реализована флуоресцентная визуализация опухолей у крыс с саркомой М-1 при использовании ФС **4** (рис. 8, *a*) и его наноструктурированной формы ФС-Au **5** (рис. 8, *b*). Из рис. 8 видно, что изменения интенсивности флуоресценции опухоли в течение 24 ч коррелирует с данными, полученными на основании расчета нормированной флуоресценции ФС методом локальной флуоресцентной спектроскопии на лазерном спектральном анализаторе для флуоресцентной диагностики опухолей «ЛЭСА-6» (ЗАО «БИОСПЕК», Россия).

Таким образом, в работе показано, что иммобилизация бактериопурпуринамида на НЧ золота увеличивает время циркуляции наноструктурированного ФС в кровотоке и повышает его тропность к опухоли за счет экстравазации наночастиц, нагруженных пигментом, из дефектных сосудов опухоли.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 13-03-00577, 14-03-00503, 15-03-02988) и НИТУ «МИСИС» (гранты К1-2014-022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bonnett, R. (1999) Photodynamic therapy in historical perspective, *Rev. Contemp. Pharmacother.*, **10**, 1–17.
- Dougherty, T.J., Gomer, C.J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, D., Korbek, M., Moan, J., and Peng, Q. (1998) Photodynamic therapy, *J. Natl. Cancer Inst.*, **90**, 889–905.
- Странадко Е.Ф. (2002) Исторический очерк развития фотодинамической терапии, *Лазерная медицина*, **4**, 4–8.
- Ronn, A.M. (1999) Pharmacokinetics in photodynamic therapy, *Rev. Contemp. Pharmacother.*, **10**, 39–46.
- Freitas, I. (1990) Lipid accumulation: the common feature to photosensitizer retaining normal and malignant tissues, *J. Photochem. Photobiol. B*, **7**, 359–361.
- Mason, M.D. (1999) Cellular aspects of photodynamic therapy for cancer, *Rev. Contemp. Pharmacother.*, **10**, 25–37.
- Vrouenraets, M.B., Visser, G.W., Snow, G.B., and van Dongen, G.A. (2003) Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy, *Anticancer Res.*, **23** (1B), 505–522.
- Allison, R.R., Downie, G.H., Cuenca, R., Hu, X.H., Childs, C.J.H., and Sibata, C.H. (2004) Photosensitizers in Clinical PDT, *Photodiag. Photodyn. Therapy*, **1**, 27–42.
- Moan, J., Peng, Q., Iani, V., Ma, L.W., Horobin, R.W., Berg, K., Kongshaug, M., and Nesland, J.M. (1995) Biodistribution, pharmacokinetic and *in vivo* fluorescence spectroscopic studies of photosensitizers, *SPIE*, **2625**, 234–238.
- Moser, J.G. (1997) Definitions and general properties of 2nd and 3rd generation photosensitizers, in: *Photodynamic Tumor Therapy, 2nd and 3rd Generation Photosensitizers* (Moser, J.G., ed.), London, Harwood Academic Publishers, pp. 3–8.
- Henderson, B.W., Sumlin, A.B., Owcharczak, B.L., and Dougherty, T.J. (1991) Bacteriochlorophyll *a* as photosensitizer for photodynamic treatment of transplantable murine tumors, *Photochem. Photobiol. B*, **10**, 303–313.
- Koudinova, N.V., Pinthus, J.H., Brandis, A., Brenner, O., Bendel, P., Ramon, J., Eshhar, Z., Scherz, A., and Salomon, Y. (2003) Photodynamic therapy with Pd-bacteriopheophorbide (TOOKAD): successful *in vivo* treatment of human prostatic small cell carcinoma xenografts, *Int. J. Cancer*, **104**, 782–789.
- Brandis, A., Mazor, O., Neumark, E., Rozenbach-Belkin, V., Salomon, Y., and Scherz, A. (2005) Novel water-soluble bacteriochlorophyll derivatives for vascular-targeted photodynamic therapy: synthesis, solubility, phototoxicity and the effect of serum proteins, *Photochem. Photobiol.*, **81**, 983–993.
- Grin, M.A., Mironov, A.F., and Shtil, A.A. (2008) Bacteriochlorophyll *a* and its derivatives: chemistry and perspectives for cancer therapy, *Anticancer Agents Med. Chem.*, **8**, 683–697.
- Mironov, A.F., Grin, M.A. (2008) Synthesis of Chlorin and bacteriochlorin conjugates for photodynamic and boron neutron capture therapy, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **12**, 1163–1172.
- Peer, D., Karp, J.M., Hong, S., Farokhzad, O.C., Margalit, R., and Langer, R. (2007) Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy, *Nature Nanotech.*, **2**, 751–760.
- Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C.K., and Rotello, V.M. (2008) Gold nanoparticles in delivery applications, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **60**, 1307–1315.
- Rana, S., Bajaj, A., Mout, R., and Rotello, V.M. (2012) Monolayer coated gold nanoparticles for delivery applications, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **64**, 200–216.
- Dreaden, E.C., Alkilany, A.M., Huang, X., Murphy, C.J., and El-Sayed M.A. (2012) The golden age: gold nanoparticles for biomedicine, *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 2740–2779.
- Bardhan, R., Lal, S., Joshi, A., and Halas, N.J. (2011) Theranostic nanoshells: from probe design to imaging and treatment of cancer, *Acc. Chem. Res.*, **44**, 936–946.
- Xia, Y., Li, W., Cobley, C.M., Chen, J., Xia, X., Zhang, Q., Yang, M., Cho, E.C., and Brown, P.K. (2011) Gold nanocages: from synthesis to theranostic Applications, *Acc. Chem. Res.*, **44**, 914–924.
- Cheng, Y.C., Samia, A., Meyers, J.D., Panagopoulos, I., Fei, B., and Burda, C. (2008) Highly efficient drug delivery with gold nanoparticle vectors for *in vivo* photodynamic therapy of cancer, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 10643–10647.
- Cheng, Y., Samia, A.C., Li, J., Kenney, M.E., Resnick, A., and Burda, C. (2009) Delivery and efficacy of a cancer drug as a function of the bond to the gold nanoparticle surface, *Langmuir*, **26**, 2248–2255.
- Cheng, Y., Meyers, J.D., Broome, A.-M., Kenney, M.E., Basilion, J.P., and Burda, C. (2011) Deep penetration of a PDT drug into tumors by noncovalent drug-gold nanoparticle conjugates, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 2583–2591.
- Srivatsan, A., Jenkins, S.V., Jeon, M., Wu, Z., Kim, C., Chen, J., and Pandey, R.K. (2014) Gold nanocage-photosensitizer conjugates for dual-modal image-guided enhanced photodynamic therapy, *Theranostics*, **4**, 163–174.
- Mieszawska, A.J., Mulder, W.J.M., Fayad, Z.A., and Cormode, D.P. Multifunctional gold nanoparticles for diagnosis and therapy of disease, *Mol. Pharm.*, **10**, 831–847.
- Galper, M.W., Saung, M.T., Fuster, V., Roessler, E., Thran, A., Proksa, R., Fayad, Z.A., and Cormode, D.P. (2012) Effect of computed tomography scanning parameters on gold nanoparticle and iodine contrast, *Invest. Radiol.*, **47**, 475–481.
- Liu, C.J., Wang, C.H., Chen, S.T., Chen, H.H., Leng, W.H., Chien, C.C., Wang, C.L., Kempson, I.M., Hwu, Y., Lai, T.C., Hsiao, M., Yang, C.S., Chen, Y.J., and Margaritondo, G. (2010) Enhancement of cell radiation sensitivity by pegylated gold nanoparticles, *Phys. Med. Biol.*, **55**, 931–945.
- Chen, X., Chen, Y., Yan, M., and Qiu, M. (2012) Nanosecond photothermal effects in plasmonic nanostructures, *ACS Nano*, **6**, 2550–2557.
- Chen, H., Shao, L., Ming, T., Sun, Z., Zhao, C., Yang, B., and Wang, J. (2010) Understanding the photothermal conversion efficiency of gold nanocrystals, *Small*, **6**, 2272–2280.
- Huang, X., Kang, B., Qian, W., Mackey, M.A., Chen, P.C., Oyelere, A.K., El-Sayed, I.H., and El-Sayed, M.A. (2010) Comparative study of photothermolysis of cancer cells with nuclear-targeted or cytoplasm-targeted gold nanospheres: continuous wave or pulsed lasers, *J. Biomed. Opt.*, **15**, 058002.
- Mironov, A.F., Kozyrev, A.N., and Brandis, A.S. (1992) Sensitizers of second generation for photodynamic therapy of cancer based on chlorophyll and bacteriochlorophyll derivatives, *Proc. SPIE*, **1922**, 204–208.
- Миронов А.Ф., Грин М.А., Ципровский А.Г., Дзарданов Д.В., Головин К.В., Феофанов А.В., Якубовская Р.И. Гидразиды в ряду бактериохлорофилла а, обладающие фотодинамической активностью, и способ их получения, Патент РФ № 2223274, 2004.
- Mironov, A.F., Grin, M.A., Tsiprovskiy, A.G., Kachala, V.V., Karmakova, T.A., Plyutinskaya, A.D., and Yakubovskaya, R.I. (2003) New bacteriochlorin derivatives with a fused N-aminoimide ring, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **7**, 725–730.

35. Миронов А.Ф., Ефремов А.В. (1996) Способ получения бактериохлорофилла а, Патент РФ № 2144085.
36. Tsygankov, A.A., Laurinavichene, T.V., and Gogotov, I.N. (1994) Laboratory scale photobioreactor, *Biotechnol. Tech.*, **8**, 575–578.
37. Tsygankov, A.A., Laurinavichene, T.V., Bukatin, V.E., Gogotov, I.N., and Hall, D.O. (1997) Biomass production by continuous cultures of *Rhodobacter capsulatus* grown in various bioreactors, *Biochem. Microbiol.*, **33**, 485–490.
38. Патрушева Е.В., Федоров А.С., Белера В.В., Минкевич И.Г., Цыганков А.А. (2007) Синтез бактериохлорофилла а пурпурной несерной бактерией *Rhodobacter capsulatus*, *Прикл. биохим. и микробиол.*, **43**, 208–214.
39. Sharonov, G.V., Karmakova, T.A., Kassies, R., Pljutinskaya, A.D., Refregiers, M., Yakubovskaya, R.I., Mironov, A.F., Grin, M.A., Maurizot, J.-C., Vigny, P., Otto, C., and Feofanov, A.V. (2006) Cycloimide bacteriochlorin p derivatives: photodynamic properties, cellular and tissue distribution, *Free Radic. Biol. Med.*, **40**, 407–419.
40. Turkevich, J., Stevenson, P.C., and Hillier, J. (1951) A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss. Faraday Soc.*, **11**, 55–75.
41. Frens, G. (1973) Controlled nucleation for regulation of particle size in monodisperse gold suspensions, *Nat. Phys. Sci.*, **241**, 20–22.

DEVELOPMENT OF NANOSTRUCTURED IR-PHOTOSENSITIZERS BASED ON BACTERIOCHLOROPHYLL *a* DERIVATIVES AND GOLD NANOPARTICLES FOR PHOTODYNAMIC THERAPY OF CANCER

**I. V. Pantiushenko¹, P. G. Rudakovskaya^{2,3}, A. V. Starovoytova⁴,
A. A. Mikhaylovskaya⁴, M. A. Abakumov⁵, M. A. Kaplan⁴,
A. A. Tsygankov⁶, A. G. Majouga^{2,3}, M. A. Grin^{1*}, A. F. Mironov¹**

¹ *M. V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow 119573, Russia; E-mail: michael_grin@mail.ru*

² *M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Moscow 119991, Russia; E-mail: alexander.majouga@gmail.com*

³ *National University of Science and Technology MISiS, Moscow 119991, Russia*

⁴ *A. F. Cyba Scientific Research Centre of Radiology, P. A. Hertsen Federal Medical Research Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Kaluga region 249036, Russia; E-mail: kaplan@mrrc.obninsk.ru*

⁵ *N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, Chair of Medical Nanobiotechnology, Moscow 117997, Russia; E-mail: abakumov88@gmail.com*

⁶ *Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region 142290, Russia; E-mail: ttt-01@rambler.ru*

Received February 5, 2015

Revision received March 7, 2015

In this work, we obtained a new sulfur-containing derivative of bacteriochlorophyll *a*. The substance was isolated from biomass of the nonsulfur purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* strain B10. The proposed photosensitizer is an N-aminobacteriopurpurinimide, the exocyclic amino-group of which is acylated with a lipoic acid residue, a biogenic substance that acts as a cofactor of the pyruvate dehydrogenase and alpha-ketoglutarate dehydrogenase complexes in the body. Due to the presence of a disulfide group in the lipoic acid molecule, the pigment acquired aurophilic properties and was immobilized on the surface of gold nanoparticles (NP-Au) by means of S-Au bond formation. The shape and the size of the resulting particles with immobilized photosensitizer (PS-Au) were determined by dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM). The nanostructured PS consists of spheres with hydrodynamic diameter of 100–110 nm. They absorb light in the region of 824 nm and have a strong fluorescence band at 830 nm, which allowed study of the kinetics of its distribution in organs, tumor, and normal tissue within tumor-bearing animals. Comparison of the biological properties of the free (PS) and immobilized (PS-Au) pigments during biological trials on rats with sarcoma M-1 showed that immobilization of the bacteriopurpurinimide on gold NP increases the circulation time of the nanostructured PS in the bloodstream and increases its tropism for tumor due to nonspecific passive targeting including extravasation of nanoparticles loaded with the pigment through the inflamed and defective tumor vessels.

Key words: bacteriochlorophyll *a*, bacteriopurpurinimide, photosensitizers, photodynamic therapy, lipoic acid, gold nanoparticles, sarcoma M-1